

新規肝臓特異的有機アニオントランスポーター LST-2の消火器癌における発現と癌治療での応用

著者	小野川 徹
号	1883
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/22326

氏 名（本籍）	おののかわ 小 野 川	とおる 徹
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）	
学 位 記 番 号	医 博 第 1 8 8 3 号	
学位授与年月日	平 成 14 年 3 月 25 日	
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻	
学 位 論 文 題 目	Molecular identification and functional analysis of a novel gene encoding human liver-specific organic anion transporter LST-2 : A new transporter which is expressed in gastrointestinal cancers and determines methotrexate sensitivity （新規肝臓特異的有機アニオントランスポーター LST-2の消化器癌における発現と癌治療での応用）	
	（主 査）	
論 文 審 査 委 員	教授 松 野 正 紀	教授 里 見 進
	教授 笹 野 公 伸	

論文内容要旨

臨床における癌化学療法は、副作用などの問題から、癌への選択的取り込みを目指すターゲティング療法が理想である。しかしながらそれぞれの臓器により用いられる抗癌剤もことなり、感受性に個人差があるのも現状である。近年、抗癌剤のこのような感受性を司るメカニズムとして、MDR 群、S-PGP 群、MRP 群など薬剤を細胞外に排泄するトランスポーターが数多く単離されてきており、これらの分子種の解析が精力的になされてきた。一方、抗癌剤を細胞内に取り込む膜輸送システムは明らかではなかった。

1999 年、当分野は、新たにヒト肝臓のみに限局して発現し、肝臓の多様な代謝機能を反映するように胆汁酸をはじめステロイドホルモンやエイコサノイドなど多様な基質認識性を有する有機アニオントランスポーター Human Liver Specific Organic Anion Transporter, LST1 を単離した。LST-1 は 691 アミノ酸からなり、疎水性解析から 12 カ所の膜貫通領域を持ち、ホモロジー解析から LST-1 は OATP 群とプロスタグランディントランスポーター (PGT) 群の間に位置する新規遺伝子であることを明らかにした。Northern blot から LST-1 の mRNA はヒト肝臓のみに発現していた。

申請者は LST-1 に相同性を有する他の OATP ファミリー遺伝子を探求する目的で、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを LST-1 をプローブとして用いてスクリーニングしたところ、LST-1 と高い相同性を有する新規 cDNA を単離し、これを LST-2 と命名した。LST-2 は 702 アミノ酸からなり、12 回の膜貫通領域を持ち、そのアミノ酸配列は LST-1 と 79.7% と高い相同性をもっていた。樹形図解析から既知の OATP 群、PGT 群とは中程度の相同性を持ち LST-1 同様の独自のグループに属していた。

Northern blot から、ヒトでは LST-2 の mRNA も胃、大腸、脾臓を含めた 21 臓器中肝臓のみに発現しており、他の臓器には検出されなかった。しかしその相対的発現レベルは LST-1 の数十分の 1 であると推定された。LST-1 と 2 それぞれの細胞内 C 末の特異的アミノ酸配列に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫組織化学的解析を行ったところヒト肝臓での LST-1 と LST-2 の区域的局在の相異と相対的発現レベルの相異が示された。すなわち LST-1 が肝小葉全体の肝細胞膜に存在するのに対して、LST-2 蛋白は中心静脈周囲の肝細胞膜にのみ限局していた。LST-2 の細胞局在をさらに検討するため、毛細胆管のマーカー CD 13 と LST-2 の蛍光二重染色を行った。LST-2 は毛細胆管側ではなく類洞側の肝細胞膜表面に発現していた。さらに肝臓における免疫電顕を行い、LST-2 の発現が類洞側の肝細胞膜表面であることを確認した。中心静脈域は低酸素状態であり、低酸素下では幾つかの遺伝子発現が誘導されることが知られている。LST-2 のゲノム配列を単離し、その上流域に低酸素反応部位の存在を確認した。これは LST-1 ではなく、LST-2 の中心静脈領域に限局した局在を説明できる可能性が示唆された。

LST-2 のシーケンスを用いヒト EST data base を検索したところ、LST-2 の配列と同一のシーケンスが胃癌の印環細胞癌由来の cDNA にあることが判明した。そこで胃癌由来の培養細胞株各種で Northern blot を行うと、LST-2 の mRNA は NUGC-4 や KATO III などに発現していた。一方 LST-1 の発現は胃癌細胞では認められなかった。KATO III を用いた *in situ* hybridization でもアンチセンス・プローブで陽性のシグナルを認めた。実際の胃癌手術標本で LST-2 の発現を検討すると、約 3 分の 1 の症例に発現を認めた。さらに Northern 陽性の標本で

LST-2の *in situ* hybridization を行うと、癌細胞に発現を認めた。他の臓器由来のヒト癌培養細胞株でも発現を検討した結果、LST-2は胃癌・大腸癌・膵癌など消化器癌細胞株で多く発現していた。しかし腺癌特異的ではなかった。一方、LST-1はHT-17という肝癌由来細胞にのみ発現していた。さらに後述するが、現在まで有機アニオンであるメトトレキセート (MTX) を輸送することが知られている唯一のトランスポーター reduced folate carrier (RFC-1) は造血系細胞によく発現していた。胃癌を含めた実際の消化器癌における Northern blot にて LST-2 は胃癌 8 分の 3 症例、大腸癌 5 分の 1 症例、膵癌 1 分の 1 症例に発現を認めた。一方、LST-1 や RFC-1 の発現は認められなかった。また Northern 陽性の胃癌・大腸癌・膵癌症例について免疫組織化学的検討を行うと、それぞれの癌細胞にシグナルを認めた。さらに Northern 陽性の大腸癌症例の転移リンパ節にも特異的シグナルを認めた。前述の通り、Northern blot では正常胃、正常大腸、正常膵臓には LST-2 の mRNA は検出されなかったが、免疫染色では非癌部にも発現を認めるものもあり、LST-2 発現の意義は現在のところ未知であり今後の検討課題となった。

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて各種薬物の取り込みを検討したところ、LST-2 は LST-1 と同様にタウロコール酸や甲状腺ホルモン、抱合型ステロイドを輸送した。さらに有機アニオンである抗癌剤 MTX は LST-1、LST-2 とともに Michaelis-Menten 式に従い輸送することがわかった。

MTX の取込みと細胞の MTX に対する感受性の関係を検討するため、LST-2 を遺伝子導入した LST-2 発現動物細胞株 MDCK/LST-2 を樹立した。この細胞は mock transfectant に比べ濃度依存性かつ飽和性に MTX を輸送し、その K_m 値もアフリカツメガエル卵母細胞での検討と同程度の値であった。次に MTT assay で LST-2 の MTX に対する感受性を検討した。MDCK/LST-2 は mock と比較し有意に MTX に対する感受性、すなわち killing 効果が上昇した。また培地に競合的拮抗剤である bromosulphophthalein (BSP) を加えることにより MTX の取り込みおよび killing を阻害した。これより、LST-2 の発現と MTX の感受性には相関があることが明らかとなった。さらに実際 LST-2 を発現している胃癌由来細胞株 KATO III、大腸癌由来の Clone A、膵癌由来の PK-8 の MTX の取り込みは BSP により抑制され、また MTT assay による感受性の検討でも BSP を共存させたときには有意に killing が抑制された。以上より LST-2 が消化器固形癌において MTX に対する感受性を決定しているトランスポーターであると結論づけた。

MTX は臨床においては主に血液疾患に用いられているが、肝障害や消化器障害が副作用にあり、消化器癌へはあまり用いられていない。今回の検討の結果、現在まで MTX を輸送する膜蛋白には 3 つあることが想定される。一つは RFC-1 であり、造血系細胞での MTX の感受性を決定するものと考えられた。一方、肝臓には LST-1 と LST-2 があるが正常において LST-1 が優位に発現しているため、肝臓での MTX の取り込みと肝細胞障害感受性は、主に LST-1 が担っていると考えられた。さらに消化器固形癌においては LST-2 のみが強く発現していることから、MTX は LST-2 に輸送され、抗癌剤として働くと考えられた。現在のところ、LST-2 特異的な輸送基質は明らかではないが、このような LST-2 特異的に輸送される抗癌剤の開発により、肝障害や骨髄抑制のない消化器固形癌特異的な癌治療の確立がもたらされることが期待される。また、特異的基質の放射線標識体によるシンチグラフィにより、転移巣検索への応用の可能性が示唆された。

なお、本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認を得たものである。承認番号 2001-002

審 査 結 果 の 要 旨

申請者小野川徹君は、大学院では肝胆膵を中心に臨床修練の傍ら、分子生物学・病理形態学の手法を用いてトランスポーター研究を遂行し多くの成果を挙げ、1999年に阿部らが単離した Liver specific organic anion transporter (LST-1) に相同性を有する他の OATP ファミリー遺伝子を探求する目的で、ヒト肝臓 cDNA ライブラリーを LST-1 をプローブとして用いてスクリーニングし、肝臓特異的に発現している LST-1 と高い相同性を有する新規 cDNA を世界で初めてクローニングし、これを LST-2 と命名し、その機能を明らかにした。さらに抗癌剤 methotrexate (MTX) を基質としうること、癌細胞に LST-2 が発現していること、LST-2 導入細胞は MTX の感受性が増大していることなど、抗癌剤の取り込み機構に関する極めて重要な知見を与え、LST-2 が消化器固形癌において MTX に対する感受性を決定しているトランスポーターであると結論づけ、*Gastroenterology* に掲載 (2001 年 6 月) された。

彼は LST-2 のクローニングから本研究に参画し、分子生物学的手法を踏まえたうえで、とくに *in situ* hybridization, immunohistochemistry, confocal laser-scanning microscopy などの病理形態学的検討では極めて優れた能力を発揮し、グループの中心として研究を遂行した。

癌領域におけるトランスポーター研究は、薬剤耐性に関与する ABC トランスポーターファミリーに関する研究がほとんどであったが、本研究は、抗癌剤の細胞内への輸送や副作用の起きる送達メカニズムを明らかにした点で申請者の発想は極めて独創的である。この様に抗癌剤の輸送・臓器送達システムの解明と副作用の起きる送達メカニズムを、自ら単離した遺伝子で明らかにした研究は無く、その成果は大いに評価されるものであり、学位論文に値するといえる。LST-2 特異的に輸送される抗癌剤の開発により、肝障害や骨髄抑制のない消化器固形癌特異的な癌治療の確立がもたらされることが考えられた。また放射線標識体によるシンチグラフィーにより、転移巣検索への応用の可能性が示唆された。本研究の成果により、LST-2 を用いて消化器固形癌を選択的ターゲットにした新規抗癌剤の開発が進んでおり、化学療法の副作用を劇的に改善する可能性があり、多くの消化器癌患者を社会的にも有意義であると考えられる。

現在、彼の成果をもとに、単離されたクローンについて特許申請を行い、消化器癌の病態解明、新規抗癌剤開発、抗癌剤有効性の判定、臓器特異的薬物輸送機構の開発を展開している。